

난자 내로의 동결보존제 유입 궤적 최적화 모델링[※]

계명대학교 의과대학 의용공학과

허윤석

Modeling for the Optimization of the Loading of Cryoprotectants to Oocyte

Yun Seok Heo, Ph.D.

*Department of Biomedical Engineering, Keimyung University School of Medicine,
Daegu, Korea*

Abstract

The inevitable use of the cryoprotectants (CPAs) during cryopreservation affects the low viability of the cryopreserved oocytes and pregnancy rates either through CPA toxicity or osmotic injury. The goal of this study is to develop an optimized CPA loading profile for minimizing the exposure to CPA and the volume change of oocyte. A computational simulation has been conducted to rationally design protocols that minimize the exposure to cryoprotectant and the volume changes of oocyte. Using a coupled differential equation with hydraulic conductivity, solute permeability, and reflection coefficient of oocyte, oocyte volume changes are predicted as function of time with the changes of the external CPA concentration. The computational simulation suggests that controlled CPA loading profile produces less volume changes and less total amounts of CPA exposure than uncontrolled CPA loading profile. Specifically, the volumetric change (less than 10%) was obtained with the linear CPA loading profile while the volumetric change in the conventional step-wise CPA profile was over 30%. The reduced volume change can reduce the cellular damage from the osmotic injury during the pretreatment for the cryopreservation. Thus, I believe that this computational modeling with controlled CPA profile will eventually help future advances in assisted reproductive technologies and fertility

※ 본 연구는 2013년도 계명대학교 비사(신진)연구기금으로 이루어졌음

교신저자: 허윤석, 704-701 대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 의과대학 의용공학과

Yun Seok Heo, Ph.D., Department of Biomedical Engineering, Keimyung University School of Medicine
1095 Dalgubeol-daero, Dalseo-gu, Daegu 704-701, Korea

Tel : +82-53-580-3735 E-mail : yunsheo@kmu.ac.kr

preservation as well as in single cell analysis technology.

Key Words : CPA toxicity, Cryopreservation, Cryoprotectants (CPAs), Osmotic injury

서론

동결보존된 인간 난자를 이용한 첫 번째 임신이 성공적으로 보고된 1986년 이후로 난자의 동결보존은 항암치료를 받는 여성의 생식 능력 보존 및 불임 치료를 위한 필수적인 도구가 되었다[1]. 하지만 최근 이러한 이점과 증가되는 수요에도 불구하고 동결보존된 난자로부터의 임신율은 여전히 매우 낮은 상태에 머물러 있다. 난자를 보존하는 동안 동결보존제(Cryoprotectant)의 불가피한 사용은 보존하는 난자의 생존력과 임신율에 직접적인 영향을 미친다. 이는 직접적으로는 동결보존제 자체의 독성을 통해서, 간접적으로는 난자의 체적 변화 등 급격한 농도 변화(삼투압 차이)에 의한 스트레스 등을 통해 야기 되는 세포 손상에 기인한다[2,3].

동결 시 생기는 얼음 결정에 의한 세포 손상을 막는 것이 동결보존제의 주 역할이며 일반적으로 동결보존제는 친수성이며 쉽게 세포 내로 들어갈 수 있고 비교적 세포 독성이 적은 물질들이 주로 이용된다. 많은 화합물이 이런 특성을 가지고 있지만 dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), propanediol (PROH) 등이 효과적인 동결보존제로 많이 사용되고 있다[4,5].

동결보존제의 독성은 크게 화학적 독성과 삼투압적 손상으로 나눌 수 있으며 이를 최소화 하기 위하여 현재 사용되는 프로토콜은 동결보존제의 절대 농도를 낮춤으로써 유독성을 감소 시키거나, 또는 세포 안으로의 동결보존제를 단계적으로 유입하여 난자의 체적 변화 및 삼투압에 의한 충격을 최소화 하는 것이다. 하지만 단계적인 동결보존제의 유입이 난자의 삼투압적 충격을 감소시키는 이점은 있으나 동결보존제에 대한 노출 시간 연장으로 인해 또 다른 난자의 손상을 유발하게 된다. 즉, 동결보존제 독성을 줄이기 위해서는 세포 체적변화를 최소화하면서 최단시간에 동결보존제를 효과적으로 세포 내로 유입시켜야 하는 동결보존제 유

입 궤적 최적화 조건에 대한 연구의 필요성이 대두되었다.

본 연구에서는 생식세포 동결에 가장 흔히 쓰이고 있는 동결보존제인 PROH의 세포막 특성 파라미터를 이용하여 동결보존제 농도의 시간에 따른 변화량 $C(t)$ 와 동결보존제와 물의 이동에 따른 난자의 체적 변화 $V(t)$ 의 미분 방정식(Coupled differential equations)을 해석함으로써 동결보존제 유입 궤적 최적화 연구를 수행하였다. 즉, 동결보존제의 다양한 농도 궤적(profiles: step-wise, linear and complex)을 시간함수 $C(t)$ 로 구현하여 난자에 유입시킨 후 각각의 궤적들(profiles)에 대한 난자의 체적(volumetric) 반응을 수학적으로 해석하였다.

이 모델링은 기존 프로토콜의 한계를 해결하고 세포 내로의 합리적인 동결보존제의 유입 및 세포의 삼투압적 충격(체적 변화 포함)을 최소화 하는 새로운 프로토콜을 설계하기 위한 이론적 기초를 제공할 것이다.

연구 대상 및 방법

세포 체적 변화 예측을 위한 수치해석 방정식

세포막을 통과할 수 있는 침입형 용질(Permeable Solute)의 이동에 의해 발생하는 세포의 체적 변화를 시간의 함수로 표현하는 식이 Jonhson 등에 의해 개발되어 사용되어 왔다[6].

$$\frac{dV}{dt} = L_p ART \left[(\pi_n^i - \pi_n^e) + \sigma (\pi_s^i - \pi_s^e) \right] \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = P_s (\Delta C_s) + (1 - \sigma) \frac{\bar{C}_s}{2} \times \frac{dV}{dt} \quad (2)$$

여기서 S는 세포 속으로 침투한 용질(solute)의 양

을 의미하며, L_p 는 막의 물 투과 계수(Hydraulic permeability of membrane), A 는 세포 표면적(Cell surface area), R 은 기체 상수(Universal gas constant), T 는 절대 온도(Absolute temperature), π^i 는 세포내 농도(Intracellular osmolality), π^e 는 세포외 농도(Extracellular osmolality), P_s 는 용질 투과계수(Solute permeability), ΔC_s 는 세포내외 용질 농도(extracellular and intracellular solute concentration)의 차이, \bar{C}_s 는 세포막사이의 평균 용질농도(mean solute concentration), 그리고 아래첨자 n 과 s 는 비침투형 용질(non-permeating solute)과 침투형 용질(permeating solutes)를 각각 나타낸다.

세포내 오스몰 농도(Intracellular osmolality)는 Boyle van't Hoff 관계식으로 정의 되어진다. 즉,

$$\frac{V}{V_{iso}} = \frac{\pi_o}{\pi} (1 - V_b) + V_b \quad (3)$$

여기서, V 는 평형상태의 세포 체적(equilibrium cell volume), π 는 실험적 오스몰농도(experimental osmolality), π_o 는 등장상태 오스몰농도(isotonic osmolality), V_{iso} 등장상태 세포 체적(isotonic cell volume)이다. 그리고 V_b 는 등장 상태 세포체적(isotonic cell volume)의 삼투적 비활성 분율(osmotically inactive fraction)로 그 값은 0.2로 알려져 있다[7]. 세포자체는 질량(mass)을 가진 물체이므로 물을 아무리 세포내에서 빼내더라도 세포체적은 0이 될 수 없다. V_b 는 이론적으로 세포가 반응할 수 있는 최소 체적으로 볼 수 있다.

수치해석 방법

이상적 세포내로의 동결보존제 유입궤적을 발견하기 위해서 동결보존제 유입 시간과 세포의 체적변화를 해석 기준으로 삼아 (1), (2) 식을 수치해석적 방법으로 계산하였다. 해석하고자 하는 내용은 난자를 동결보존제 PROH로 전처리 할 때 총 노출 시간을 15분으로 했을 때 세포 체적 변화가 최소가 되는 동결보존제 궤적을 구하는 것이다. 수치 해석 방법은 먼저 총 주입 시간(15분)을 x 축으로, 세포 체적 변화를 y 축으로 하여

기준을 잡는다. 그 다음 바둑판의 격자 모양처럼 x 축의 시간을 6초 단위로 나누었을 시 x 축은 총 150개의 구간으로 나뉜다. 나누어진 각 구간(매 6초 간격)의 시작 시간과 종료 시간 사이에 세포 체적 변화(y 축)가 1% 이내가 되게 하는 동결보존제 농도 궤적을 구한 다음 각각의 구간을 연결하여 전체적인 동결보존제 궤적 형상을 구현하였다.

결 과

본 저자는 2011년에 미세유체공학(Micro-fluidics)과 생물리화적인 기술(Biophysical technology)을 결합한 새로운 형태의 세포분석 시스템을 개발하였다[8]. 즉 미세유체 유동장치의 분석 공간에 난자를 안전하게 트랩(trap)한 이후, 냉동보존제의 다양한 농도 궤적(profiles: step-wise, linear and complex)을 조절하여 난자에 주입시킨 후 각각의 궤적들(profiles)에 대한 난자의 체적(volumetric) 반응을 측정된 결과를 토대로 동결보존제 유입 궤적 최적화 연구를 수행하였다. 여기서는 기 발표된 논문[8]의 실험적 결과를 바탕으로 수치해석적 방법을 통한 세포막 특성 변수 및 동결보존제 유입 궤적에 대한 저자의 추가적인 고찰을 기술하였다.

동결보존제 처리시 난자 체적 변화

다양한 농도 변화를 발생시키는 유체혼합기(fluidic mixer)와 난자를 일정한 분석지역에 트랩(trap) 할 수 있는 기능을 결합한 미세유체 장치[8]를 이용하여 측정된 동결보존제의 농도 변화에 따른 난자의 체적 변화를 분석하였다. Fig. 1에서 보듯이 등장액에 놓여 있는 세포는 원래 자신의 체적을 유지한다(Phase 0). Phase 0에서는 세포의 체적 변화가 없기 때문에 변화된 체적을 원래 체적으로 나눈 값인 normalized cell volume은 1이다. 하지만 세포를 1.5 M PROH의 고장액 동결보존액에 옮기면 삼투현상에 의해 물이 세포내에서 먼저 빠지기 시작하여 초기 세포 체적이 감소하는 현상이 발생한다(Phase 1). 주어진 조건에서 도달 할 수 있는 최소 체적값에 도달한 후 동

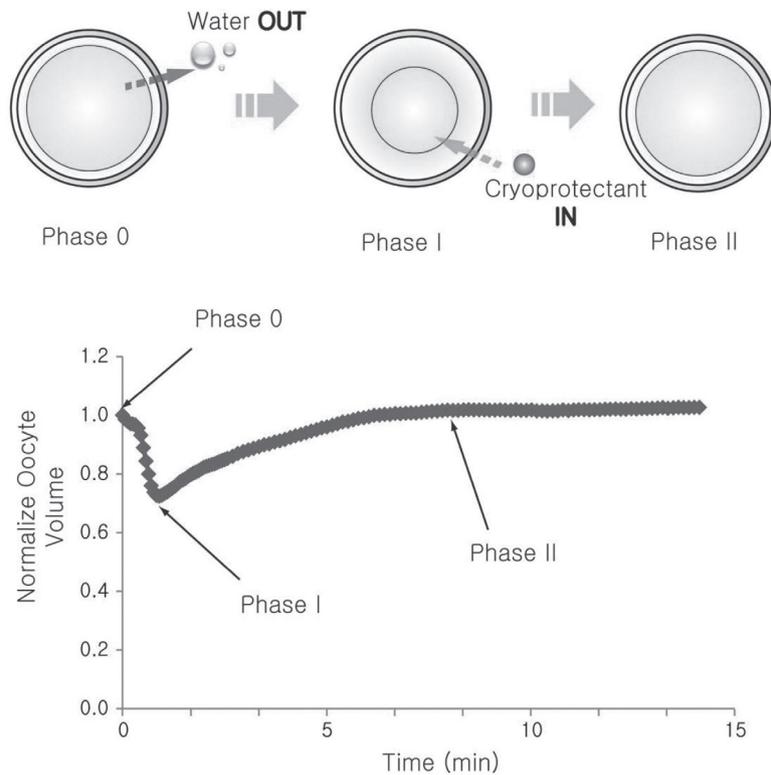


Fig. 1. Oocyte volumetric responses to the exposure of cryoprotectant.

결보존제가 세포내로 주입되기 시작하여 원래 체적으로 회복한다(Phase II). 실험에 의하면 1.5 M PROH의 경우 세포 체적이 30% 정도 감소한다.

물론 실제적으로는 반드시 순차적으로 물이 먼저 빠지고 침투형 동결보존제가 나중에 채워지는 것이 아니라 순간 순간 물의 이동과 동결보존제의 이동이 평형을 이루면서 앞에서 기술한 이론적 수치방정식(1), (2)를 만족하면서 이동한다. 물의 이동이 용질의 이동보다 상대적으로 빠르기 때문에 해석의 편의상 Fig. 1 처럼 세포의 체적이 초기에 감소했다가 다시 회복하는 것을 물과 용질의 상대적 이동으로 표시하였다.

세포막 특성 변수

Fig. 1에서 구한 난자의 체적 변화를 곡선일치법(curve fitting method)을 통해 계산하여 세포막 특성 변수들을 구하면 Table 1과 같다. 즉, 막의 물 투과 계

수(Hydraulic permeability of membrane, L_p)는 $0.50 \pm 0.03 \mu\text{m}/\text{atm}/\text{min}$ 이고, 막의 용질 투과 계수(Solute permeability of membrane, P_s)는 $0.32 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{sec}$ 이고, 반발 계수(Reflection Coefficient, σ)는 0.50 ± 0.03 이다.

계산되어진 세포막 특성 변수를 이용하여 앞에서 기술한 미분 방정식을 풀어야 하기에 측정된 세포막 특성변수의 정확도가 결국 모델링 해석의 정확도와 직결된다. 따라서 세포막 특성 변수들의 정확도를 이전에 발표된 논문의 값들과 비교해보면 다음과 같다.

Fuller 등[4]에 의해 발표된 L_p 의 값이 다른 값들 보다 큰 것은 초기 개발된 측정장치의 정확도가 떨어져 실험적으로 측정한 값의 오차에 기인한다고 유추되어진다. 용질의 이동 정도를 나타내는 P_s 의 값은 보고된 세 값들이 유사한 범위에 놓여 있다는 것을 알 수 있다 [5]. 또한 용질이동에 의하여 삼투압이 감소하는 정도를 반사계수(reflection coefficient, σ)로 표시하는 데

Table 1. Membrane parameters of mouse oocytes exposed to 1.5 M propanediol (PROH)

L_p	P_s	σ	Reference
2.20 ± 0.86	0.48 ± 0.20	0.71 ± 0.21	Fuller 1992
0.36 ± 0.04	0.24 ± 0.04	0.99 ± 0.005	Paynter 1997
0.50 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.50 ± 0.03	Heo 2011

어떤 물질이 세포막을 전혀 통과 할 수 없으면 σ 는 1이고 자유롭게 통과한다면 σ 는 0이 되어 삼투압이 없게 된다. Table 1에 표시된 세 개의 값은 0.5부터 0.99까지 범위가 상대적으로 넓게 분포하는 데 이는 아직까지 σ 를 정확히 예측하기 위한 모델링이 완벽하지 않음에 기인한다. σ 의 경우 그 값이 주장하는 그룹에 따라 달라 질 수 있는 데 이에 착안하여 L_p , P_s , σ 를 모두 이용한 삼 매개 변수(three parameter) 미분 방정식 대신에 L_p , P_s 만 사용한 이 매개 변수(two parameter equation) 미분 방정식도 현상을 설명하는 데 무리가 없다는 보고가 있다[9]. 요약하면 본 논문에 사용된 L_p , P_s , σ 값은 다른 논문과 비교해 볼 때 유효한 해석 값이므로 본 논문이 제시하는 모델링도 유효한 정확도를 제시한다고 볼 수 있다.

동결보존제 유입궤적 모델링

앞에서 구한 L_p , P_s , σ 를 가지고 상용 해석 프로그램인 Matlab을 이용하여 주어진 미분 방정식을 계산하였다. 먼저 앞에서 제시한 모델링 조건(구간에 따른 1% 미만의 체적 변화)을 만족하는 최적화된 동결보존제 유입궤적을 먼저 구한 다음 유입 궤적에 따른 세포 체적의 변화를 도시하였다. Fig. 2는 세 가지 다른 동결보존제 유입 궤적을 나타낸다. 하나는 난자를 동결보존제를 가지고 처리하는 일반적인 방법으로 등장액에서 고장액으로의 급격한 농도 변화(Step-wise)를 주는 형태이다. 이 경우 세포의 최대 체적변화는 약 30% 정도이다.

다른 하나는 선형(Linear) 농도 궤적이다. 시뮬레이션을 통한 추가적 고찰에 의해 찾아낸 흥미로운 사실은 단순 선형 농도 궤적 보다 변형된 선형 농도 궤적이 더 효율적으로 세포의 체적 변화를 감소시킨다는

것이다. 즉 초기 농도가 0이 아니라 0.2 M 처럼 초기값을 가진 냉동보존제의 선형방정식적 유입이 보다 더 최소화된 체적 변화를 줄 수 있다(Fig. 2 (a),

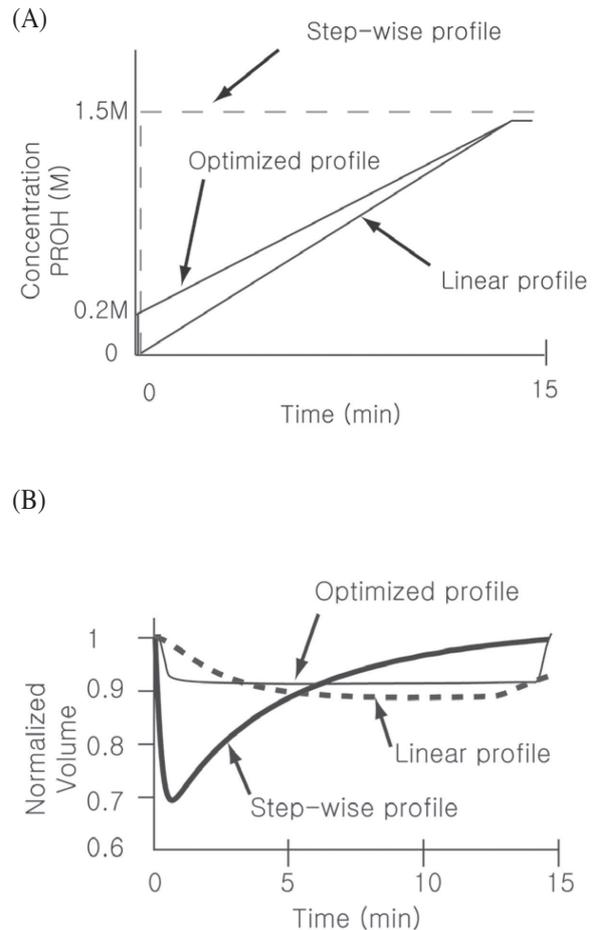


Fig. 2. (A) Cryoprotectant loading profiles: step-wise profile, linear profile and optimized profile. (B) Simulated oocyte volumetric responses with step-wise profile, linear profile and optimized profile.

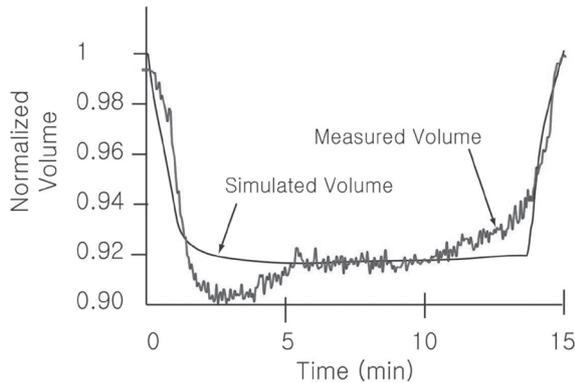


Fig. 3. Oocyte volumetric response with “optimized” loading profile: simulated volume and measured volume.

Optimized profiles: y 절편이 0이 아니라 0.2의 값을 가지는 예). 세가지 농도 궤적(Fig. 2 (a))에 따른 계산된 난자 최적 변화를 Fig. 2 (b)에 나타내었다. 최적 궤적(optimized profile)의 경우 단순 선형 프로파일 보다 농도 변화가 적으며(90% Vs. 92%)상대적으로 빠르게 원체적으로 회복하기 때문에 동결보존제의 노출 시간을 좀 더 줄일 수 있는 장점이 있다. 선형 및 최적 궤적(optimized profile)은 두 개의 프로그램 제어가 가능한 주사기 펌프(programmable syringe pump)를 사용하여 구현할 수 있다[8]. 예를 들어, 1.5 M PROH를 담은 주사기(syringe 1 ml)를 한 쪽 주사기 펌프(syringe pump)에 설치하고 PROH가 들어 있지 않은 세포 등장액을 담은 syringe (1 ml)를 다른 쪽 주사기 펌프(syringe pump)에 설치 한 다음 세포 등장액 주사기 펌프(syringe pump)는 원하는 최대 유량에서 정지 상태 까지 선형적으로 감소하고 동시에 PROH가 들어 있는 주사기 펌프(syringe pump)는 제로 유량(정지 상태)에서 최대 유량으로 증가하면 우리가 원하는 농도 궤적(profile)을 구할 수 있다[8]. 이를 바탕으로 실제 선형 및 최적화된 동결보존제 유입 궤적에 따른 난자의 체적 변화 모델링과 실제 측정된 난자의 체적 변화를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 1의 경우와 비교해 볼 경우 세포 체적 변화가 30% 에서 10% 이내로 감소되는 것을 알 수 있다.

고찰

동결보존제는 모든 살아있는 세포의 동결보존에 필수적이거나 아직까지 동결보존제의 독성에 대해 많은 부분이 밝혀지지 않고 있으므로, 동결보존제의 독성에 대한 연구가 선행되어야 한다. 동결보존제의 독성은 화학 약품의 고유 특성들 즉 노출기간과 온도에 의존한다. 독성을 최소화하기 위해 저온에서 세포내로 동결보존제를 급속히 침투는 시키는 것이 바람직하다.

동결보존제의 독성은 노출 시간에 비례하지만 노출 시간을 줄이면 세포 체적의 변화 또한 증가한다. 이러한 급격한 체적 변화는 삼투압 충격과 같은 생물학적 스트레스를 통해 세포 손상의 원인이 될 수 있다. 따라서 이상적 동결보존제 유입궤적은 세포내에서 얼음 결정이 형성되지 않도록 필요한 동결보존제 농도를 세포 체적 변화를 최소화하면서 빠른 시간에 효과적으로 유입하는 것이며 본 연구의 수치해석적 접근 방법은 향후 이상적인 동결보존 방법(protocol)을 개발하는 데 이론적 근거로 활용될 수 있을 것이다.

참고 문헌

1. Chen C. Pregnancy after Human Oocyte Cryopreservation. *Lancet* 1986;1:884-6.
2. Williams RJ, Shaw SK. The Relationship between Cell Injury and Osmotic Volume Reduction. 2. Red-Cell Lysis Correlates with Cell-Volume Rather Than Intracellular Salt Concentration. *Cryobiology* 1980;17:530-9.
3. Mazur P, Schneider U. Osmotic Responses of Preimplantation Mouse and Bovine Embryos and Their Cryobiological Implications. *Cell Biophys* 1986;8:259-85.
4. Fuller BJ, Hunter JE, Bernard AG, McGrath JJ, Curtis P, Jackson A. The Permeability of Unfertilized Oocytes to 1,2 Propanediol - a Comparison of Mouse and Human-Cells. *Cryo Letters* 1992;13:287-92.
5. Paynter SJ, Fuller BJ, Shaw RW. Temperature dependence of mature mouse oocyte membrane

- permeabilities in the presence of cryoprotectant. *Cryobiology* 1997;**34**:122-30.
6. Johnson JA, Wilson TA. Osmotic Volume Changes Induced by a Permeable Solute. *J Theo Biol* 1967;**17**:304-11.
 7. Hunter JE, Bernard A, Fuller BJ, McGrath JJ, Shaw RW. Measurements of the Membrane Water Permeability (Lp) and Its Temperature-Dependence (Activation-Energy) in Human Fresh and Failed-to-Fertilize Oocytes and Mouse Oocyte. *Cryobiology* 1992;**29**:240-9.
 8. Heo YS, Lee HJ, Hassell BA, Irimia D, Toth TL, Elmoazzen H, *et al.* Controlled loading of cryoprotectants (CPAs) to oocyte with linear and complex CPA profiles on a microfluidic platform. *Lab Chip* 2011;**11**:3530-7.
 9. Elmoazzen HY, Elliott JAW, McGann LE. Osmotic transport across cell membranes in nondilute solutions: A new nondilute solute transport equation. *Biophys J* 2009;**96**:2559-71.
-